

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-501140

第6部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)2月2日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
G 01 N 30/48	G	8310-2J	
B 01 D 15/08		8014-4D	
G 01 N 30/48	M	8310-2J	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

(21)出願番号	特願平5-507935	(71)出願人	コーネル・リサーチ・ファウンデーシヨン・インコーポレーテッド
(36) (22)出願日	平成4年(1992)10月21日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・ゾーンウッドドライブ20・スイート105
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)4月15日	(72)発明者	フレチエット, ジーン・エム・ジエイ
(86)国際出願番号	PCT/US92/09100		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・フェアウエイドライブ25
(87)国際公開番号	WO93/07945	(72)発明者	スペク, フランティセク
(87)国際公開日	平成5年(1993)4月29日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14853イサカ・アパートメントデイ25・メイプルアベニュー201
(31)優先権主張番号	7 7 9, 9 2 9	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉
(32)優先日	1991年10月21日		
(33)優先権主張国	米国 (US)		
(81)指定国	E P (AT, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, S E), J P		

(54)【発明の名称】 マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

## (57)【要約】

マクロ細孔ポリマープラグの形態で分離用媒体を含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムを開示する。このカラムは、ビードまたは粒子が充填されている通常のカラムに比べて数多くの利点を有している。このプラグは、直徑が200nm未満の小さい孔と、直徑が600nm以上の大きい孔の両方を含んでいる。

## 請求の範囲

1. 試算管と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面を模切って伸びているマクロ細孔樹脂ボリマーの少くとも1種の連続ブラグを含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムにおいて、このブラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と、約600nm以上の大径を有する大きな孔を含んでおり、そしてこの大きな孔が、このブラグの全細孔容積の少くとも約10%を占めているカラム。

2. 该マクロ細孔ボリマーブラグが約30から90%の精度率を有している請求の範囲1のカラム。

3. 試管がマクロ細孔ボリマーの2種以上の異なるブラグを含んでいる請求の範囲1のカラム。

4. 该マクロ細孔ボリマーがポリビニルモノマーのボリマーを含んでいる請求の範囲1のカラム。

5. 该マクロ細孔ボリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合物を含んでいる請求の範囲1のカラム。

6. (1) 同様に前記する管に、ガロゲンを含んでいたり強化した重合樹脂物を加入し、(1)この高分子物を巻ききることでマクロ細孔有機ボリマーブラグを生じさせ、そして(1)このマクロ細孔ボリマーブラグを作ることでそのガロゲンを熱脱し、そして約200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の大径を有する大きい孔とを含んでいるブラグを生じさせる段階を含む、請求の範囲1のカラムを構成する方法。

7. 試管合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を加算するに先立って混合を実施する請求

## の範囲6の方法。

8. 少なくとも2種の異なる高重合物を連続的に加え、これらの高重合物の各々に関して、次の混合物を添加するに先立って混合を実施する請求の範囲6の方法。

9. 该混合段階を、該ブラグを試管の中に巻きながら実施する請求の範囲6の方法。

10. 最初に試管から該ブラグを取り出し、このブラグを洗浄した後、このブラグをその管に巻くことによって、該洗浄段階を実施する請求の範囲6の方法。

11. 该ブラグを試管に巻いた後、このブラグを巻ききせる請求の範囲10の方法。

12. 该重合混合物がポリビニルモノマー、開始剤およびポロゲンを含んでいる請求の範囲6の方法。

13. 该重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいる請求の範囲12の方法。

14. 该重合混合物が更にポリマーを含んでいる請求の範囲12および13の方法。

15. 该ボリマーが可溶ボリマーである請求の範囲14の方法。

16. 该ボリマーが不溶ボリマー粒子である請求の範囲14の方法。

17. 该ボリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立って、この重合混合物に相溶性を示さない液体に溶解する請求の範囲16の方法。

18. 该不溶ボリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを、該重合混合物内に存在しているのと同じモノマーから生じさせる請求の

## 範囲15の方法。

19. 請求の範囲1から5のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。

20. 試管管と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面を模切って伸びているマクロ細孔樹脂ボリマーの少くとも1種の連続ブラグを含んでいるカラムにおいて、このブラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでおり、そして重合溶媒および水から選択される液体を少なくとも約200cm<sup>2</sup>/時の溶出速度および約30MPa(4,500psi)未満の圧力で通過させ得るカラム。

21. 該大きな孔が、該ブラグの全細孔容積の少くとも約10%を占めている請求の範囲20のカラム。

22. 该マクロ細孔ボリマーがポリビニルモノマーのボリマーを含んでいる請求の範囲20のカラム。

23. 该マクロ細孔ボリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合物を含んでいる請求の範囲20のカラム。

## 明 稚 者

マクロ細孔ボリマー媒体が残っているカラム

## 発明の背景

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を実行させるべきサンプルを球形ビードの床に通すことによって実施されている。これらのビードは、通常、これらのビードの間の隙間を直径にしてこのカラム効率を増大させるような様式で、管またはカラムの中に入設されている。球形粒子を担体とする伝統的な合成ルートは、軽微量分析によるものである。この球形の粒子におけるモノマー粒子の選択は、その分離能に溶解性を示さないモノマー粒子に限定されている。従って、この技術を全てのモノマーに適用することは不可能である。この技術の実施は容易であるが、得られるビードはむしろ多分散したサイズを有するものである。従って、充填するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一般的に、時間のかかるサイズ分離を繰り返して実施する必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間が必要とすると共に高価である。

カラム効率を改善するには小さい粒子またはビードを用いる方が望ましい、と言うのは、このようなビードは一般に開頭体積が小さくなるよう充填するのにより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば酸素を用いた重合などによって達成され、そしてこのようなビードが、より高い効率を達成する目的でカラム内に用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくなければならぬ程必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じていた。カラムが短くなることに加添した特定の問題は解決され得る。短く

特表平7-501140 (3)

した長さを直角を大きくすることによって修正しない限り、そのように短くしたカラムのカラム容量が小さくなってしまう（これによって分離容量が小さくなる）。分離に関しては、通常、これらのビードが有する孔径が均一性を示す高分子のストックス（Stokes）直徑の約倍以上である時、最適の結果が達成される。その結果として、これらのビードは非常に高い孔径を示す必要があり、従って、これらは低い機械強度を示すことから充填するのがやや困難になる。このような技術的の限界から、彼ら用カラムの直徑および分離能を増大させる目的で粒子サイズを更に小さくする方向は終点に近づいていると見られる。

現在良好な品質を示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60%の孔隙率を有している。この微孔容積を増大する方法は知られているが、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に働く傾向を示すことから、それらを示す機械的特性はHPLCで開拓されている基準に到達していない。カラム効率を改良する目的で他の通常でないアプローチが試みられてきた。

例えば、Bio Radは、蛋白質をクロマトグラフィー分離する目的で、テルロン（Teflon）（商標）ポリマーをエクス（全液体の10%）の中にスチレーン-ビニルベンゼンのイオン交換樹脂（90%）をさせた0.4mm厚の充填層であるBio-Rad（商標）を製造している。テフロンボリマーを10%用いた場合、これらがビード間に完全に位置している時でさえも、それらの間の開き空間を完全に閉じることは不可能であり、粒子間にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがそれの臨時の最大効率に到達する所を都度している。

PC-T公報No. 95/07985では、重力流れ（加圧流れではなく）で用い

るに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ（plus）が開示されている。このプラグは、流体力学的流れを可能にするに充分な大きさを有する鳥居とチャネルが含まれている。このプラグは、アクリル樹脂とメレンジアスピカルアミドとの複合混合物を含んでいる。このPC-T公報No. 95/07985出版の2ヶ月後に出発されたEijerent社、J. Chromatograph y. 474 (1989)、273-276には、このPC-T公報の中に開示されているプラグは圧力をかけると崩壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると示されている。この問題を解決する目的で、Eijerentは、このプラグを強力に圧縮してそれの分離能と共に圧力を計算する能を増大せることを推奨している。このような結果は、本来、このプラグの中に不均一なチャネルを有させることであり、その結果として、理屈のなからぬ効率が得られるのである。

米特許第4,889,632号、4,923,610号および4,852,342号（Svec伯）には、いわゆる「恩クロトグラフィー」のための薄層クロマト法が開示されている。これらの段はボリマーのマクロ孔隙シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカットリップはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、恩クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその道を通過する時、通り越され吸收-脱離過程は全く存在しないからである。

Konakura社、J. Mat. Sci. 24 (1989)、1809-13には多孔質ボリマー複合カラムが開示されている。このボリマー材料は、-7.8°Cの放熱キャッピング液面によりモノマー層の組み合わせから製造されている。その得られるボリマー材料は、直徑が0から4.0ミクロンに及ぶ程度で大きな穴を含んでおり、サブミクロンの孔ではない。その結果と

して、カラム効率は理屈から理屈のものである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填層クロマトグラフィーカラムに開拓した問題を完全に解決するものではない。

ヨーロッパ特許第0,231,644号には、適当な位置にキャスト、即ち波クリア度内に直線上に、或は屈曲部等クリア度内の波りとして前記均に、単に分離用媒体を適当な位置に維持している多孔質のセラミック、即ち波クリアプラグが示されている。クロマトグラフィーカラムが開示されている。このセラミック型プラグは分離用媒体ではない。

従って、本発明の目的の1つは、即ちこれまでおり本質的に全く開拓用媒体を有していない、クロマトグラフィーカラムで用いるに適した分離用媒体を製造することにある。

本発明の目的の2つは、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの最終使用に適合させる目的でこの分離用媒体を直角に合わせることが可能なように、多孔性モノマー樹脂をオリマー状の、即ち有機の分離用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、例えば蛋白質質媒体、ミセルまたは細胞などを分離するための分離用媒体となり得る細胞床を製造することにある。このような大きな物の特徴は、通常の充填カラムを用いた場合には、その充填された粒子間の間隙空間におけるせん断力による劣化を受けることから分離不可能である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

#### 発明の開示

従って、本発明は、通常カラム、肝連ではクロマトグラフィーカラムを開拓したものであり、これは、内部直角領域を横切ってそのカラムの中に配置されている波状したマクロ孔隙ボリマー材料から成る少なくとも1種のプラグを含んでおり。この波らわるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示すと共に、これはまた、液体を通過させる能を有していることから、種々の检测過程、診断過程および吸収過程で利用される。本発明に従うマクロ孔隙ボリマー材料は、約1mL/g以上、好適には、0.5mL/g以上の波の直角度（それの孔の中に非特異性溶媒を吸収する能）を示す。これらの特徴は、小さい時、即ち直徑が2.0mm未溝の孔ばかりでなく、大きな時、即ち直徑が少なくとも0.60mmの孔をも含んでいる。このカラムの内部直角領域を横切って伸びるマクロ孔隙媒体のプラグは、少なくとも約5mmの直さを有している。この直さによって、このプラグが異なる位置から区別される。このプラグは、肝連では、約5から2.0mmの直角の厚さ（反対）を有する直く伸びた細胞材料である。单一のプラグを用いるのが現在の肝連であるが、特に複数のプラグが異なる組成または構造を有している場合、多数のプラグを用いることも可能である。従って、多数のカラムを列にして用いる代わりに、それらの吸収特性を同一の連続カラム内に工学的に組み込むことも可能である。このように、上方のプラグに、インジケーターと対立するイオンクロマトグラフィーに適した特徴を与え、そして次の次のプラグに、所定の分離を合わせることを可能である。

このマクロ孔隙ボリマーは、ポリビニルモノマーか、波はより肝連にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開始剤およびポロゲン（porogen）の存在下で重合させることを経由して製

述される。この重合混合物はまたマクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。この重合混合物をそのカラムに加えた後、マクロ細孔ポリマー プラグが生じるようにその中で重合を開始させる。次に、この有機ポリマー プラグを適切な液体溶媒中にて溶解する。溶解した溶液を

本発明の少なくとも1のマクロ粘乳ポリマー方法は複数種様体が人でいるクロマトグラフィーカラムは、従来技術の充填カラム以上の利点を有している。例えば、本発明のカラムは、粒子間隙が存在していないことから非常に高い通量が得られることで、カラム充填が非常に異なる。これにより、非常に高い通量が得られることで、カラム充填が非常に異なる。この点は、通常のビードまたは粒子詰め込みが必要でないことから、調整が容易である。むしろ本発明のカラムは、ロードの位置下部まで異なる異なる構造を有する複数種様体で形成される。本発明のカラムが示す別の利点は、この分離用様体を生じさせる技術でないモノマー化を選択する多様性を示すことがある。このような多様性は、多式の異なるモノマーを用いることが可能であるところの、このマクロ粘乳ポリマー方法の柔軟性から生じるものである。

### 因の精緻な説明

図1は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵アルブミンのイオン交換クロマトグラムである。

図2は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵白蛋白質のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、実施例Vの選択カラムを用いた時の、モデル蛋白質混合物の

圖 11. 實驗測量人耳對個人不同音頻的反應。

多数のプラグを用いることができる。2個以上のプラグを用いる場合、これらの大きさおよび／または組成は同一か或は異なっていてもよい。

この用語はラグマ、約2.000 nm程度の小さい孔を含んでいます。これに加えて、非常に大きな孔も含んでいます。この細胞膜の一例は、直徑約8.0 nm、厚さ約0.6 nm以上から約3.0 nmに及ぶ大きな孔によって構成される。纤毛には、これらの大きな孔は、直徑約、約8.0 nmから6.2、1.0 nmより纤毛には約8.0 nmから2.0 nm、最も纤毛には約9.0 nmから2.0 nmである。これらの大きな孔は、このラグマ孔と細胞膜の約1.0 nm程度の間合、その背後がより高さである。纤毛には、これらの大きな孔は、全細胞孔群の少なくとも約10%を占めている。これらの大きな孔は、全細胞孔群の約1.0 nm程度の間合、その背後がより高さである。纤毛には、これらの大きな孔は、全細胞孔群の少なくとも約20%を占めている。どう違うは、孔が大きければ大きいほどこれを溶かす速度にかかると背後が低くなるからである。これらの大きな孔は、全細胞孔群の約5%を占めています。孔の大きさによって、孔の大きさは約1.0 nmに約0.8から2.0 nm、より纤毛には1から10 nmの範囲である。

この漏られるボラグはまた、液クロス流が通常漏れられている圧力、即ち単位圧力 ( $6.000 \text{ MPa}$ ) に及ぶ圧力で、このボラグを遮るシート上における分離用媒体として利用できる充分性に亘るものである。このボラグは、1 植以上の資源浴槽と水を含んでいる或て液体のものが、約  $3.0 \text{ MPa}$  ( $4.500 \text{ psi}$ ) 未満の圧力下で、厚さが  $150 \text{ mm}$  のボラグを少なくとも  $200 \text{ cm}^3/\text{min}$  の断続流量で漏洩することが可能な

これらのカラムを製造する方法は、一般に、(1) ボロゲンが入っている脱気した重合可逆混合物を、重箱を用いて所要の大きさに。(2)

図5は、実験例VIIのプラグによる背圧と流量との関係を示す曲线である。

図6は、実施例VIIのプラグに関する、チトクロームC、ミオグロビンおよびニワトリ赤アルブミンの勾配溶浴クロマトグラムである。

より詳細には、本発明のカラムは、纤径には筒状であるが長方形または角形であるてもよい。本質的に硬質の管を含んでいる。この管は、耐熱性、ガラスおよび硬質ポリマーを含む、クロマトグラフィーカラムの構造で用いられる通常の材料のいずれかから作られていてもよい。この管は規定された形で柔軟性を示してよいが、これは本質的に強く、その結果として、この重合装置を行っている間、その管の容積変化は本質的に生じない。この管は次の用法として用いる場合、この管の外端を水槽、液クロロに通す孔に通じた継ぎ手で閉じる。本分野で知られているが如きの通常の継ぎ手用いられねば。

この管の中に、マクロ孔有りリテラーカラム少なくとも1種のグラブを配置させる。カラム外部用接着剤としてマグブリムに適するベニサンブルをこのグラブに適度に通す必要があるように、このグラブは、この管の内部面表面を完全に密接して伸びている。このマグの原さは約5mm以上であり、そのことからこれは膜から區別される。これの膜は、論的、このカラムの大きさに存在している。一時に、このマグの原さの新面積は、底平方ミクromēトルから数平方メートルの範囲であり（利用する管の大きさによってのみ限界がある）、そしてその底、幅、長さは約5から200mm、もしくはそれ以上である。このマグの原さは、グラブが貼り付けている位置を除くと、1つのグラブが

この混合物を重合させることでマクロ細孔ポリマー一プラグを生じさせ、そして(3)このプラグ(またはプラグ類)を溶媒で洗浄することにより、その製造したマクロ細孔ポリマー内に存在しているポロゲンを除去する。ことをもくじけ。

この重合混合物は、最小限、少なくとも 1 位のポリビニルモノマー、フリーラジカルを発生する開始剤、およびポロゲンを含んでいる。この混合物はまた、1 価以上のモノビニルモノマー類および/または可溶ポリマー類または不溶マクロ乳波リマーワークスを含んでいてもよい。

用いられるモノビニルモノマー類には、ステレン、環状換ステレン類（これらの中環基にはクロロメチルが含まれる）、1,8個の以下の炭素原子を有するアルキル、ヒドロキシル、1-ペチルオキシカルボニル、ハロゲン、ニトロ、アミノ基、保護されているヒドロキシルまたはミノ基、ビニルアセタート、アセト酢酸、アセト酸、アセト酸アセチル、アセト酸アセト酢酸、アセト酸アセト酸アセチル、アセト酸アセト酸アセト酢酸アセチル等である。

特表平7-501140 (5)

ルアセテート、ビニルビロドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマーか、或はポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この混合化合物の中に約1から80体積%の量、より好適には約20から40体積%の量で存在している。

使用的するポロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択され得る。例えば、適切な液状ポロゲンには、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エスチル類、アルコール類、ケトン類、エーテル類、可溶ポリマー類の液状およびそれらの混合物が含まれる。このポロゲンは、一般に、この混合化合物の中に約40から90体積%の量、より好適には約50から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合わせて、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらの可溶ポリマー類は、混合に先立ってその混合化合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、プラグに混合を遅すことによって、そのプラグが生じた後のプラグから溶出して来る。これらの可溶ポリマー類は、通常の可溶ポリマー類には、ステレンまたは芳香族スチレン、アクリレート類、メタクリレート類、ジエン類、環化ビニル類および脂肪ビニルの如きモノマー類の未重合ポリマー類または芳香族化合物が含まれる。混合中に重合が収束するのを遅くする目的で、不溶ポリマー粒子を用いる。この混合化合物内のモノマー類の併用が遅延される。重合した後の体積膨脹が小さくなる。ここで用いるに適した不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の重合化合物であるマクロ孔孔ポリマー粒子が含まれる。しかしながら、その混合化合物を生じさせる目的で用いたのと同じモノマー類から生じ

させた不溶ポリマー粒子を用いるのが、混合物の点から現在のところ好適であり、これとそれを組み合わせる。これらのポリマー粒子は、最初約1から1,000ノックロードの直徑を有している。このポリマーパーティクルの混合物は同じ粒子サイズを有している必要はない。実際、不規則な大きさを有するポリマー粒子を用いる方が優遇的であり、従って現在のところ好適である。必要ではないが、これらのポリマー粒子を、フリーラジカル混合を禁止する禁止剤が入っていてもよい。混合化合物に混和せざる液体に浸漬してもよい。これは、孔の詰まりの原因となると共に有効にそれらをその分散過程から取り去るマクロ孔孔粒子内部の重合を防ぐ目的で行るものである。このロットは、その時、この分散過程に直面せざる無活性ブルを含んでいる。適切な止剤には、酸化第二鉄および硫酸ナトリウムが含まれる。この止剤は、全粒子重量を基準にして約0.001から1重量%の量、より好適には約0.1から1重量%の量で存在している。

好適には、この混合化合物用に先立って、これらのポリマー粒子の重合を行なう。これは、本分野で知られている通常の手段のいずれかを用いて達成され得る。しかしながら、任意に混合禁止剤が入っている水の中にこれらの粒子を浸漬した後、約5から20分間の適切な切削、水流ポンプ真空下にこの水-ポリマー粒子混合物を保持することによって、それらから空気を除去するのを現在のところ好適である。次に、過剰水を通過してよい。該可溶ポリマー類は、一般にこの混合化合物の約5から40体積%の量で存在しており、そして不溶ポリマー粒子は約5から50体積%の量で存在している。

重合を開始させる目的で、フリーラジカルを発生する通常の混合開始

剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、O-O-ヒアミル-0-(2-エチルヘキシル)モノバーオキシカルボネート、リプロビルバーオキシカルボネートおよびビペンゾルバーオキサイドの如きバーオキサイド類、並びにアソビススピリテチロニトリル、2,2'-アゾビス(2-アミジンプロパン)リヒドロトリオキドおよび2,2'-アゾビス(イソブチルアミド)二水化物などが含まれる。プラグ内の孔分布を四面側に設けして開始剤の選択がより有利であることが見出された。特に、アソビススピリテチロニトリルを用いて混合を実験する時、その大きな孔を全表面の50%以上であるが、それをペソジルバーオキサイドに置き換えると、その大きい孔の孔径は全孔表面の20%にまで低下した。この開始剤は、一般に、既モノマーの約0.2から5重量%の量でその混合化合物内に存在している。

この混合化合物をその管内に入る前に先立って、この混合物の中に存在している歯状を除去するに充分な割合、歯状の如き不活性ガスをこの混合物の中にバランシングなどの如き通常の手段で、この混合物の脱気を行なう。この混合物を調製して脱気を行なった後、これを、適切な進ぎ手で混合器を用いたりする管の中に入れる。この混合化合物の全表面を加えた後、重合させて第一プラグを生じさせる。別途として、この混合化合物を分割して加えてよく、各加え加えから次の添加を行なうまで重合を行う。逐次した添加で同じモノマー混合物を用いること、即一プラグラムが得られる。2段以上の異なる混合化合物を逐次して用いること、その方法では、2種以上の異なるプラグが生じる。現在のところ好適なものは第一プラグラムである、と言うのは、これは現在通常の充填カラムによりよく適合しているからである。多段プラグ技術を通常の装置に適用する

のは困難であり、この技術は、1つの單一カラム内に異なる分離用柱体を実際に組み合わせることの利点を用いる新規なクロマトグラフィー式柱と一様に競争に用いられる。次に、重合を行う準備としてこの管を密封する。

この混合物をその管の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90°Cの温度の通常様式で混合を実験する。この混合は、好適には重合またはアルゴンなどの不活性ガス混合気内で実験される。本分野で知られている何らかの手段を用いて熱をかけることも可能であるが、この混合化合物が熱によって重合した管を、加热した管の中に浸漬するのを現在のところ好適である。混合中に生じる収縮はその混合化合物全体に影響を与えるが、この収縮量の量との関係は維持される。

混合が完了した後、この固体状のマクロ孔孔ポリマーを洗出すことで如何なるポロゲン溶液も除去し、そして適切な溶媒を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄溶媒には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびキオキサンが含まれる。この洗浄溶媒は長時間にわたってよく、例えば、溶媒に続いて水で洗浄した後、再び溶媒で洗浄するか、或は溶媒を用いて洗浄をすることによって行われてもよい。この洗浄溶媒は、好適には、そのマクロ孔孔ポリマーが詰まっている管を洗してその内部をよく掃除することによって実現される。

特定の場合として、特にこのカラムの次の使用にとってこのマクロ孔孔ポリマーに待った官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することができる。例えば、

このマクロ組合ボリマーが混合させたメタクリル酸ジリジンを含んでる場合、このボリマーとジエチルアミンの組合アミンとを反応させるとN,N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル(DEAHP)基が生じ、或は脱脂トリエチルアミンと反応させると第四級トリメチルアミノ(Q)基が生じ、また、このボリマーが有するエボキシ基の加水分解を最初に反応させた後クロロの加水分解をするとカルボキシチル(CM)基が生じ、或は発煙試験-1、4-ジオキサン合体と反応させるとカルボン酸(SP)基が生じ得る。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィーを使用蛋白質分離に用い得る。アルコートラート、或いはカルウムプロテート、オクチラートおよびヘキサデシラートなどと反応させることにより、このマクロ組合ボリマーに酵素基を与えることができる。この他の基は、酵素相互作用における分離および選択標準に必須である。また、このボリマーを、單一化合物または小さい群の化合物に特異的な基別剤(affinates)と反応させて、これをアフィニティーコロマトグラフィーで用いることができる。適切な親和剤は抗体、抗原、染料、熱感、レクチン類、蛋白質および核酸である。同様な様式で、また、他のモノマー類と組むボリマー類を有効して、全ての候選のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このプラグを適切な溶媒で洗浄したかは1段操作で洗浄してよい。

この洗浄段階に関連した更に別の代替方法は、その煮合したプラグをそのままから取り出し、適切な溶媒でそれを洗浄した後、これをそのままに戻すことを待っている。この煮合したボリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1、4-ジオキサン、トルエンまたはハロゲン化水素の如き溶媒で溶解してそのままの形態を

生じさせることにより、その管の中より広い空間を占めさせないようにすることができる。

この洗浄段階の後、そのマクロ組合ボリマーが入っている管は使用準備が出来ている。これは、本分野で如られている通常の技術に従い、連続クロマトグラフィーカラムとして用いられると共に、触媒、診断剤たるは検査方法の目的で用いられる。例えば、この管をクロマトグラフィーカラムとして用いたサンプルをその成分に分離する場合、このサンプルのための粗体として水または緩衝液を用いることができる。このサンプルが入っている溶液をシップ種離することにより、それを、その管の中に入っているプラグに送る。溶離剤の割合、例えば、イオン後、荷重溶液合有量などを変化させることにより、分離を実行させる。この組成の勾配は、粗体、荷重液または対象の加水分解何れも影響を及ぼす。次に、その分離されたサンプルの抽出は、本分野で知られてる手順を用いてそのカラムそのものを自身の中か、或はこのカラムからその成分が個々に溶解して来る時、このプラグの下流またはこのカラムの側面で達成される。洗浄剤に用うるマクロ組合ボリマー分離用媒体は、約1000から100万の範囲の分子量を有する材料の分離に有効性を示す。完全カラムを用いて行われる剖離なる分離も本洗浄のカラムを用いて実施され得る。

以下に必ず非剝離的実施例を参照して本発明をここに記述するが、全ての説明およびパーセントは、特に明記されていない限り質量である。

#### 実験例1

試料に取り付けるに適した握り手が両端に複数個のステンレス鋼製握り(内部直径が4.6mmであり、長さが50mm)の1つの末

端を、解剖ネットストップによって閉じ、この管を室温バージした後、そのもう一方の末端を、シリコングローブで閉じた。4.8gのメタクリル酸ジリジン、3.2gのジメチルアミドジエチレン、1.0g、0.8gのシクロヘキサノール、1.2gのデカノール、および0.08gのアゾビスイソチオニトリルを混合することによって、混合化合物を調製した。この化合物に蒸煮を20分間バーバーすることによって、存在している如何なる核酸も除去した。この混合物の0.1mLを、その隔壁を通して他の管の中に注入した後、熱電炉で70℃にてオイルバスの中で加熱することにより、混合を開始させた。7時間後、その管をそのままから取り出し、放置して室温にて冷却した後、その隔壁を取り外した。この時まで、このカラムは、長さが50mmの圓筒状マクロ組合ボリマーのプラグを含んでいた。このボリマーはメタノールで洗浄した後、この管の両端面をクロマトグラフ用ネットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを貯める流量でそのカラムにポンプ送り出した。その背圧は、0.5mL/minの流量の時0.4MPaであり、流量が1mL/minの時0.8MPaであり、そして2mL/minの時1.6MPaであった。次に、この溶媒をテトラヒドロフランに変えた後の背圧は、0.2mL/minの時0.2MPaであり、そして2mL/minの時1.9MPaであった。この流量に対する背圧の線形性は良好であることが示された。

これらの測定の後、このカラムの底を開いて、溶媒圧を用いてその多孔質ボリマーロッドを取り出した。

#### 実験例1-1

既重合ストック溶液を0.1mL用いる以外は実験例1と同様な措

作を用いた。この管から取り出した後のプラグの長さは9mmであった。

このグラフを5.0mLの丸底フラスコの中に入れた後、ジエチルアミンを5mL加えた。この内容物を3時間搅拌させた。その後混合させたメタクリル酸ジリジンと他のエボキシ基がそのアミンと反応することによって得られる。この反応が終了した後、このロッドをメタノール、水、再びメタノールで洗浄した後、乾燥させる。このDEAHP混合有量は1.59ミリモル/gであることが確認された。

この洗浄させたプラグをそのままのカラム管に差し、水の中に2時間浸漬し、その水洗を繰り返して閉じた後、1つの本管をHPLCクロマトグラフのポンプに接続する一方、もう1つを後出管に接続しないままにしておいた。このような構造でその背圧を測定した。流量が1mL/minの時の背圧は0.5MPaであり、3mL/minの時のそれは1.3MPaであり、そして5mL/minの時のそれは2.2MPaであった。UV検出器に連絡した後の背圧は、0.5mL/minの流量の時0.4MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのすぐが生じなくなるまで(20分間)、0.02mL/minのトリス-HCl緩衝液( $\text{pH}=7.3$ )( $\text{緩衝液A}$ )を、0.5mL/minの流量で用い、クロマトグラフィー条件で洗浄した。0.21gのチトロカロム、リソチーム、ミオグロビンおよびオボアルブミンが入っている溶媒を、ループを通過して注入した後、上記ボリマーの連絡点が吸収するまでにした。このカラムを洗浄した上記緩衝液のポンプ輸送を20分間行った後でも、漏れの兆候は全く見ら

れなかった。その後は全体的であった。次に、匀配活版を開始した。この溶剂剤を塗液表面から離脱液表面（表面張力の1モル/Lの塗化ナトリウム）に、1.0分以内に遮断して使用させた。この手試験で用いたクロマトグラフィー条件は選択性的な条件から選定し、4種の蛋白質全ての分離が確認された。これらの蛋白質の保持時間は7.4、7.7、7.9および8.1分であった。

### 实施例111

実験例1で用いたのと同じ管の中に、3 mlのスチレン、1、2 mlのジブリルベンゼン（5% HのDVB）、6 mlメタベニズルアルコールおよび0.05 gのベンゾイルペーパーオキサイドから成るストップ混合物を0.3 ml注入した。吸収した後、この管を閉じ、そして蓄合を70度で24時間進行させた。環状ブランジャーを用い、長さが18 mmの多孔質リマーブラグをその管から押し出した後、メタノールを100滴に分けて、その中で4時間洗浄した。この洗浄後でもこのブラグは元の管に合致していた。この管をテラヒドロフランに変えると、これはそのブラグの脂溶性を生じさせた。約20分後、このブラグの脂溶性は、その管の管壁以上にならなかった。次の脂溶抽出メタノールを用いて、このブラグを尽可能大きさまで吸収させた。その後、このブラグをそのカラムに閉じ、そしてメタノールをテラヒドロフランに交換した。このカラム内における筋膜を骨質の変化として監視し、この変化は、この管の残りの部分がまだメタノールで満たされているため0.3 MPaから始まって、この溶胞のいくらかが吸収された後の1.0 MPa以上にまで上昇した。その時点で、この装置に付けるからかの可能な筋膜が生じるのを防止する目的で、この测定を終了した。

ニトリルを溶かすことによって、混合粘合物を製した。この混合物を水洗抗張は低下で1.5分間脱脂処理した後、更に1.5分間昇温をパブリックすることによって、溶解して気泡を除去した。このカラムの管を、上記混合物で完全に満たした後、この室を密封した。この混合室を70 °Cの恒温室内で時間経行させた。この混合が終了した後、このカラムをその容器から取り出し、そして再び温度室まで持移されたが、このカラムが5.6mmであるそのロッドを表す目的で、このカラムの両端間に在るストッパーをクロマトグラフィー用継ぎ手に挿入した後、このカラムをPVCクロマトグラフに取り付いた。最初に、タマノールを異なる流量でこのカラムにポンプ供給することでこのロッドの洗浄を行なうと同時に、このカラムを異なる流量で試験した。この昇圧は、0.5 mL/minの流量の時0.8 MPaであり、1 mL/minの時1.9 MPaであり、2 mL/minの時4 MPaであり、そして5 mL/minの時13 MPaであった。この昇圧は、この洗浄操作全体を通して変化しなかった。このカラムを通してポンプ供給したタマノールの全量は200 mLであった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り外しした。このカラムの入口と出口に1mの3%のケルセルミンを注入した。このカラムの入り口と出口を、デルリン (delrin) ブラグで閉じた後、このカラムを、熱湯で80°Cにした浴槽の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラムに取り付けた後、その反応後のアミンをメタノールで洗浄した。この洗浄過程で、このブラグは詰まり、そしてこの詰まりたがムラマニが部分的にその孔を占めると、これは、この洗浄過程で抑制した後の背筋が高いことで説明される。この背筋は、疾患が2mL/分の時3

麦地树：V

豆を10分間パブリシングすることによって、実験例1に記述したモノマーの混合物を熟成した。マクロ組成は「アクリラル基シリジル基-ルゴーコジメタクリル酸ジメチル」ビードを留置液に浸漬した後、この水-ボーリマ-混合液をエチレンシングラフ下に10分間置くことによって、それらが有する孔から空気を除去した。次に、これらのビードを減圧して過剰水を挿去した。次に、これらのビード約1.0 gを、選択的に留置バーナーしている90%ガラスビンの中に仕込み、上記熟成した混合物を0.5 ml加え。この分散液をガラス棒で搅拌した後、このビードを密封した。その重合を70 °Cで6時間進行させた。この重合が終った後、このビードの内容物は均一であるように見えた。このメタクリル酸ジシリジルが有するエポキシ基とそのガラス表面が有するシリジル基が反応するところから、このビードの構造を生じさせることなくこのビードからそのブロッカを離すのは不可能であった。そのようにしても、そのブロッカ表面からそのガラスを剥離させるのは非常に大変であった。このブロッカは、小さい片に剥離する傾向を示さないか、或はそのビードとそれと連結している共重合体とのフランジメントは分離する傾向を示さなかった。

### 實施例V

ステンレス製曲カラム（内部直径が8mmであり、長さが50mm）の1つの末端を密封し、アルゴンでバージ洗浄した後、そのもう一方の末端をシリコンゴム隔壁で閉じた。3.6mLのメタアクリル酸グリシル、2.4mLのジメタクリル酸エチレン、7.2mLのシクロヘキサンール、1.8mLのデカノール、および0.6gのアゾビスピソブチロ

2 MPaであり、そして1 ml／分の時の5 MPaであった。メタノールを用いて5分間洗浄した後、水-メタノールの1:1 混合物を用いた。その後は、0.5 ml／分の流量の時の2 MPaにて上所述したように1時間後、このメタノール-水混合物を蒸留水に交換した。この昇圧は、血量が0.5 ml／分の時の6 MPa、そして1 ml／分の時の12 MPaにて低下した。最後に、このカムラム0.02モル／Lのトリス-HCl緩衝液 (pH=7.6) (標準液A) で洗浄した。洗浄が0.5 ml／分の時の昇圧は、7 MPaであった。

ニクタリアルアルブミン ( $8 \text{ mg/mL}$ )、ニクタリアル白蛋白質 ( $1 \text{ mg/mL}$ ) およびモデル蛋白質混合物 ( $1.6 \text{ mg/mL}$ ) が入っている複数 (21)、 $\beta$ -乳球を通過した後、緩衝液との混合の際にまで、その連続マクロ球孔ボリマーブラグの上に 1 分間吸着させることにした。緩衝液底 (緩衝液 A の中に 1 mol/L の NaCl) の濃度匀配を用い、 $0.5 \text{ mL}/\text{分}$ の流量で記載蛋白質の溶出を行った。図 1-3 は示す限りのクロマトグラムは、それぞれアルブミン (1)、白蛋白質 (2) およびモデル蛋白質 (3) に関するものである。21.8 nm の凝固でこれらの検出を行った。匀配クロマトグラフィーに通常の如く、用いた培地溶液は勾配から、図 1-3 のペースラインは等でない。これらの固内溶液はクロマトグラムであり、そして溶質組成の変化を示す目的で、濃度をえた。

## 実施例VI

直径が8 mmであり長さが50 mmのステンレス鋼管の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう1つの末端を固体状シリコンゴムプラグで閉じた。3 mLのステレン、2 mLのジビニルベンゼン、7

## 特表平7-501140 (8)

5 mLのグリコノールおよび0.5 gのアソビスイソブチロニトリルを混合することによって、混合混合物を調製した。直後を15分間ペジすることによって、この混合物の発泡を行った。この混合物を、その隔壁を通してその調製室の中に注入した後、熱電対で70°Cにした空気浴内でその温度を加熱することにより、混合を開始させた。20時間後、この混合をその熱風から取り出し、そして周囲温度にまでゆっくりと冷却した。このカラムの開端部にあるストップバーパーを取り外して、標準的なクロマトグラフィーカラム端子に取り替えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で1時間、そして1 mL/分の流量で30分間洗浄した。この2番目の洗浄操作中の背圧は一貫して0.2 MPaであった。

このカラムの出口を開け、そして20 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその混合したロッドを押し出した。このロッドを空気で乾燥し、岱縮して小さな片にした後、水銀ボロメトリー (pore slurry) を用いて、このボリマーの孔サイズ分布を評価した。この分布曲線を図5に示すが、これは明らかに、2.00 nm未満の小さい孔と1.00 nmの大きな孔の両方が存在していることを示している。

## 実験例V-1

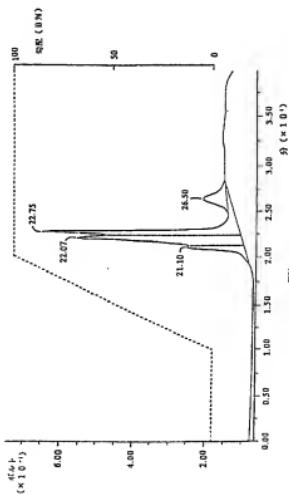
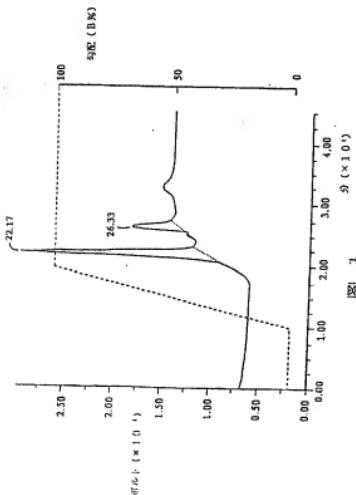
メタノールを用いた洗浄操作が実施した後、このカラムの出口端を手をUV検出器に連絡する以外は、実験例V-1の操作に従ってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル水の1:1の混合物を用い、1 mL/分の流量で2時間平衡にした。次に、この平衡を達成した数段階で25 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図5に示すが、ここでは、その流量に対する背圧の图形を示す。

が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに適当な背圧、即ち約4.0 MPa (6,000 psi) 以下の範囲のまま、非常に高い流量でこの逆流ロッドカラムが背圧であることを示している。

チトロームC、ミクロロビンおよびニクトリルアルブミンが入っている溶液をこのカラムに注入した後、勾配溶浴クロマトグラフィーを開始させた。水から20%のアセトニトリルから水まで0%のアセトニトリルへの線形勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終混合物に変化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で4分、10 mL/分で2分、15 mL/分で1.3分、そして25 mL/分で0.8分であった。このクロマトグラムを図6に示す。

## 柱操作例V-1

そのステンレス鋼製管を軟質のボリ (テトラフルオロエチレン) 管に巻き換える以外は実験例1の操作を繰り返す。そのボリーブラグが壊れているその得られる管を通常のクロマトグラフに連結した場合、4.0 MPa (6,000 psi) の加圧高い圧力でも、このプラグを通過テトラヒドロフランの流れは本質的に全く競合されなかつた。実験例V-1と同様に、この管を切り離してそのプラグを取り出すことによってこのプラグの孔サイズ分布を評価した時、約2.00 nm以上の孔は全く見いだされなかつた。



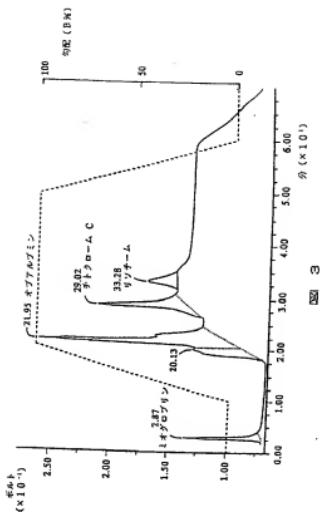


図 3

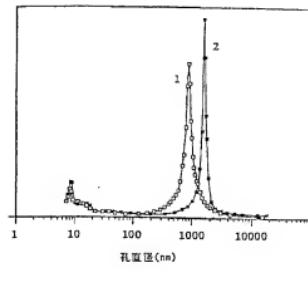


図 4

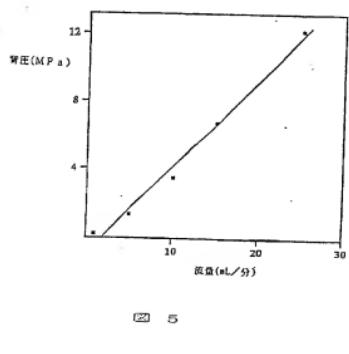


図 5

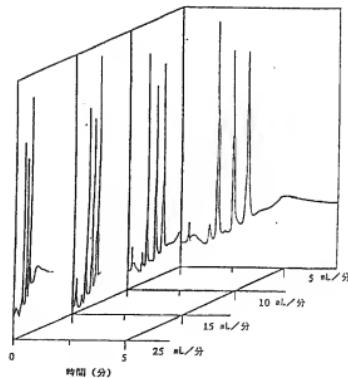


図 6

補正者の申し（翻訳文）提出書（特許法第184条の8）

平成6年4月15日

明細書

マクロ孔孔ボリマー柱体が備わっているクロマトグラフィーカラム

特許庁長官 棚生 達郎

## 1. 特許出願の表示

PCT/US92/09100

## 2. 発明の名稱

マクロ孔孔ボリマー柱体が備わっているカラム

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国ニューヨーク州14450イサカ・ソーンウッドドライブ20・スイート105

名称 コーネル・リサーチ・アンド・エンジニアリング・ラボラトリ

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区1丁目9番15号

日本橋税關会館

氏名 (5078) 井理士・小島・平吉

電話 3585-2256



## 5. 特許の提出年月日

1994年1月13日

## 6. 種別書類の目録

(1) 补正書の申し（翻訳文）

1通



た。カラムが短くなることによって発生した特定の問題は解決される。短くした長さを直径を大きくすることによって前記しない限り、そのように短くしたカラムのカラム外径が小さくなってしまう（これによって分離容量が小さくなる）。分離に関しては、通常、これらのビードが有する孔孔径が分離すべき高分子のストックス（Stocks）直径の2倍以上である時、高分子が通過される。その結果として、これらのビードは非常に高い多孔性を示す必要があり、従って、これらは低い被膜強度を示すから光学的な高分子が複数個になる。このような技術的難点から、複数クロマトの速度および分離能を増大させる目的で粒子サイズを更に小さくする方向で研究がなされていると見られる。

現在販売が示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60

児の間隔準を有している。この粗孔密度を増大する方法が知られている

が、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に能くなる傾向を示す

ことから、それらが示す機械的強度はHPLCで期待されている基準に

到達していない。カラム効率を改善する目的で他の選択でないアプローチが試みられてきた。

例えば、Bio Radは、蛋白質をクロマトグラフィー分離する目的で、

テフロン（Teflon）（樹脂）ボリマー・エップ（全体積の10%）の中に

ステレンジビニル・ベンゼンのオキシ換樹脂（0.0%）を含ませた0.

4mmの粒度であるBio-Rex（樹脂）を製造している。アクリルボ

リマーと10%をいた場合、これらがビード間に完全に充填している時

できまし、それらの間の間隙空間を完全に占めることは不可能であり、

粒子間にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがその理論的

大効率に到達するのを妨害している。

## 発明の背景

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を受けさせべきサンプルと柱形ビードの表面に適すことによって実現されている。これららのビードは、通常、これらのビード間の間隙体積を最小にしてこのカラム効率を最大化するような後式で、管またはカラムの中にも充填されている。柱形ビードを製造する技術的な合成法は墨墨合によるものである。この種の結合におけるモノマー類の選択は、その分離部に溶解性を示さないモノマー類に限定されている。従って、この技術を全てのボリマー類に適用することは不可能である。この技術の実際は容易であるが、用いられるビードは必ずしも分離したサイズを有するものである。従って、実現するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一概に、特に、特にかかるサイズに分別して取り扱う必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間を必要とすると共に高価である。

カラム効率を改良するには小さい粒子またはビードを用いる方が簡便しい。と言うのは、このようなビードは一枚に固有体積が小さくなるように充填するのがより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば自己用いた籠などによって達成され、そしてこのようなビードがより高い効率を達成する目的でカラム内で用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくなければなる程必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じてき

PCT公開第90/07059では、電気炉（加熱されではなく）で用いに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ（plug）が開示されている。このプラグは、液体力学的流れを可能にするに十分な大きさを有する亜鉛とチタンニルが含まれている。このプラグは、アクリル酸とメチレンジアクリルアミドとの混合高分子を含んでいる。このPCT公開第90/07059出願の2ヶ月後に出願されたH.J. Bierthorn, J. Chromatogr. 473 (1989)、273-275には、このPCT公開のものに開示されているプラグは圧力をかけると崩壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると開示されている。この問題を解決する目的で、H.J. Bierthornは、このプラグを強力に圧縮してその分離部と共に圧力に耐える能力を有させることを実現している。このような圧縮は、本実験のプラグの中に不均一なチタンニルを生じさせるものであり、その結果として、理想的なカラム効率よりも低くなるものである。

米特許第4,389,632号、4,923,610号および5,525,349号（5ecc社）には、いわゆる「鏡クロマトグラフィー」のための溝溝マクロ孔板が開示されている。これらの板はボリマーのマクロ孔シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカートリッジはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、鏡クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその板を通過する時、繰り返される吸収-脱離過程は全く存在しないからである。

Kumakura他、J. Ret. Sci. 24 (1989)、189-193には多孔質ボリマー一層全体カラムが開示されている。このボリマー材料は、-78°Cの放射キャスティング重合によりモノマー類の組み合せから製造されている。その得られるボリマー材料は、直角が1.0から4.0ミクロンに及ぶ

極めて大きな穴をさんでおり、サブミクロンの孔ではない。その結果として、カラム効率は理屈から言葉でものである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填床クロマトグラフィーカラムに開示した問題を完全に解決するものではない。

ヨーロッパ特許第8,231,844号には、過当な粒度にキャスト、即ち液クロ装填率に直接にか、或は起振界溝クロ装填内の粒りとして間接的に、單に分離用媒体を過当な粒度に維持している多孔質のセラミック、即ち無機グラフが後わっているクロマトグラフィーカラムが開示されている。このセラミックアダグリダは分離用媒体ではない。

米国特許第5,019,210号には、液流、特に生物学的材料成合物の高分離能および高生産性粒度を可能にするとして主張されている液流クロマトグラフィー方法およびマトリックス構造が開示されている。この方法は、特別に設計されたクロマトグラフィーマトリックスに流体を高流速で通すことを伴うものである。これらのマトリックスは、複数連結している1番目と2番目の孔を規定していると共に、2番目の孔の孔の一員との供給路線における粒度相互作用のための高い表面積を規定している。この1番目と2番目の孔の孔は、粒子間の割れ目およびそれらの粒子内の通孔 (throughpores) として具体化されている。これらの孔は、造成される高い表面積において、両方の孔の孔の中に充満流れが生じそしてこの対流流量がその2番目の孔の内部粒度を越えるよう寸止めをしている。このアプローチは、活性をもす表面からそれをへの対流と粒度の物質移動を対することによって、通常に予測されるバンドスプレッディング (bandspeading) を生じさせることなく流速の増大を可能にするものである。

を有しておりそしてこれらの大きな孔を分離孔容積の10%以上、平均には少なくとも20%以上を有している分離用媒体をインサチューで成形してはじきませるものではなかった。従って、本発明の目的の1つは、市販にあっており本質的に全く同様体を有していない、クロマトグラフィーカラムに用いるに適した分離用媒体を製造することにある。本発明の別の目的は、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの過当粒度に適合させる目的でこの分離用媒体を注文に合わせるが可能なように、多様なセラミックからセラミック一状の、即ち有機の分離用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、例えば蛋白質凝集物、ミセルまたは球状などを分離するための粗粒媒体となり得る過濾床を製造することにある。こののような大きな物の特徴は、通常の充填カラムを用いたのでは、その充填された粒状物の間隙空間におけるせん断力による劣化を受けることから分離不可能である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

#### 発明の図示

従って、本発明は、液体クロマトグラフィーに適した過濾カラムを製造したものであり、これは、内部断面形状を接合してそのカラムの中に配置されている過濾したマクロ細孔ボリマー材料の少なくとも1種のプラグカラムをその中に含んでいる。この得られるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示すと共に、これはまた、液体を通過させる能力を有していることから、種々の触媒過程、診断過程および吸収過

程英特許第1,188,738号には、親水性マクロ細孔共重合体のインサイチュー過濾が開示されている。エチレングリコールのビスマクタクリレート、エチレングリコールのモノメタクリレート、フリーラクリル酸剤、およびベンゼンまたはトルエンから成る混合物を、密閉法は形成した混合物の内側で密閉させている。重合後、このベンゼンまたはトルエンを除去し、そしてこの攪拌を示さない吸収カラムまたは同様の装置は、液体および非極性化合物を製造する目的およびガス分析における極性化合物用液体を製造する目的で用いられる。この共重合体はまた、ガス-液界面における定常濃度のための基質として、純粋用不活性基質として、並びに吸収およびまたは被離用媒体として用いられる。

クロマトグラフィー分離用媒体をインサイチューで製造する試みには米国特許第3,541,007号、3,580,543号および3,785,392号が含まれる。米国特許第3,541,007号には網状の過濾気泡フォームが開示されており、ここでこの小孔は單に0.5 mmであり、そして好適には、このフォームを使用する目的でカラムの中に入れるに先立って、これを剪断して粒子を生じさせている。米国特許第3,580,543号には連続気泡ポリレーション構造が開示されており、これは、ガスクロ分離用媒体として有効であるが、これを液体で用いるには、このカラムに液体を添すに必要なとする圧力が極めて高いことを認み、それで用いるには充分な大きさの孔が割れていな。米国特許第3,785,392号には、分配剤を用いて分離用媒体をクロマトグラフィーカラムの壁に化学的に結合させることが開示されている。

この従来技術のいずれも、液体クロマトグラフィーで有効な分離用媒体、即ち200 nm未満の小さい孔と500 nm以上の大きな孔の両方

で利用され得る。本発明に従うマクロ細孔ボリマー材料は、約0.1 mJ/m<sup>2</sup>以上、好適には0.5 mJ/m<sup>2</sup>以上の溶媒表面張力 (これらの孔の中に非溶媒性液体を吸収する能力) を示す。これらの材料は、小さい孔、即ち直径が200 nm未満の孔ばかりでなく、大きな孔、即ち直径が少なくとも約600 nmの孔も含んでいる。このカラムの内部断面形状を構成して神のマクロ細孔ボリマーのプラグカラムは、少なくとも約5 mmの厚さを有している。この厚さによって、このプラグは単なる膜から区別される。このプラグは、好適には、約5から200 mmの範囲の厚さ (長さ) を有する長く伸びた棒状材料である。单一プラグを用いるのが現在の所持場所であるが、特に複数のプラグカラムがある組合または複数を有している場合、多数のプラグカラムを用いることも可能である。従って、多数のカラムを割りとして用いる代わりに、それらの収容特性を單一の過濾カラム内に工学的に組み込むことも可能である。このように、上方のプラグカラムに、イオン顕と対立するイオンクロマトグラフィーにした抑制特性を与え、そしてその次のプラグカラムに、所定の分離を行わせることも可能である。

このマクロ細孔ボリマープラグカラムは、ポリビニルモノマーか、又はより好適にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開発剤およびポリソルベント (porogen) の存在下で重合させることを經由して製造される。この重合混合物はまたマクロ細孔ボリマーラズ子を含んでいても。この重合混合物をそのカラムに加えた後、マクロ細孔ボリマープラグカラムが生じるようにその中で重合を開始させる。次に、この有機ボリマープラグカラムを洗浄的な液体で洗浄することでそのポロゲンを排出する。

本発明の少なくとも1種のラック組合ボリマープラグカラム分離用媒体を含んでいるクロマトグラフィーカラムは、誘導技術の充実カラム以上の利点を有している。例えば、本発明のカラムは、分子間体積が存在していないことから密に詰まっている。これにより、非常に高い通過率が得られることで、カラム効率が非常に高くなる。このカラムは、底介など一または柱子詰め込みが必要でないことから、装置が容易である。むしろ、本発明のカラムは、ポリゲンの存在下で実施される複雑な重合方法を用いて製造される。本発明のカラムが示す別の利点は、この分離用媒体を生じさせる目的で用いるモノマー化学を選択する多様性を示すことである。このような多様性は、多様の異なるモノマーを用いることが可能であるところの、このマクロ相孔ボリマー一方の柔軟性から生じるものである。

#### 図の記載と図説

図1は、実施例Vの逐級カラムを用いた時の、ニワトリ卵アルブミンのイオノ交換クロマトグラムである。

図2は、実施例Vの逐級カラムを用いた時の、ニワトリ卵白蛋白質のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、実施例Vの逐級カラムを用いた時の、モデル蛋白質混合物のイオン交換クロマトグラムである。

図4は、実施例Vで製造したプラグカラムの孔サイズ分布曲線である。

図5は、実施例Vの1のプラグカラムによる発癌と致癌の関係を示す曲線である。

図6は、実施例Vの1のプラグカラムに関する、テクロームC、ミ

オクロビンおよびニワトリ卵アルブミンの分配率クロマトグラムである。

#### 好適な遮離の評定

より詳細には、本発明のカラムは、好適には筒状であるが長方形または多角形であってもよい。本質的に選択の概念を含んでいる。この管は、金属、ガラスおよび耐熱ボリマーを含む。クロマトグラフィーカラムの製造で用いられる通常の材料のいずれかから作られていてよい。この管は限定された度合で柔軟性を示してもよいが、これは本質的に堅く、その結果として、この重合反応を行っている間、その管の形状変化は本質的に生じない。この管をクロロルカラムとして用いる場合、この管の各部は、被クロロ化されるに適した形状で用いる。本分野で示されている如何なる通常の詰め手も用いられ得る。

この管の中に、マクロ相孔有孔ボリマーから成る少なくとも1種のプラグカラムを配置させる。カラム分離用媒体として働くプラグカラムには適切なラベルをこのプラグカラムに貫通させる必要があるように、このプラグカラムは、この管の内部表面を完全に密接して伸びている。このプラグカラムの厚さは約5mm以上であり、そのことからこれで微から区域される。これで全体寸法は、勿論、このカラムの大きさに適切である。一概に、このプラグカラムの前面は、数平方ミクロメートルから数平方メートルの範囲であり（利用できる管の大きさに従ってのみ制限される）、そしてその厚さ、即ち高さは約5から200mm、もしくはそれ以上である。このマクロ相孔プラグカラムが示している管の長さをばす目的で、1つのプラグカラムが或は多数のプラグカラムを用いることができる。2種以上のプラグカラムを用いる場合、これら

の大きさおよび/または組成が同一か成る事はないでよい。

この得られるプラグカラムは、約200nm未満の小さい孔を含んでいることに加えて、非常に大きな孔も含んでいる。この開閉部の一部は、直通が約600nm以上から始め、0.00nmに及ぶ小さな孔によって導かれる。好適には、これらの大きな孔は、直通で、約800から2,500nm、より好適には約800から2,000nm、差々好適には約800から2,000nmである。これらの大きな孔は、このプラグカラムの全孔容積の少なくとも約10%を表している。これらの大きな孔が全孔容積の約1.0%未満の場合、その背压が高くなり過ぎるであろう。好適には、これらの小さな孔は、全孔容積の少なくとも約2.0%を表している。と言うのは、孔が大きければ大きいほどそこを通る液体にかかる負担が低くなるからである。これらの大きな孔は、全孔容積の約5.0%以上を表すことさえできる。小さい孔の大きさは200nm未満、一般に約0.8から200nm、より好適には1から約100nmの範囲である。

この得られるプラグカラムは主たる、壁クロロ化が通常選択されている圧力、即ち約4.0MPa (6,000psi) に及ぶ圧力で、このプラグカラムを被クロロ化する分離用媒体として利用できる圧力に於いて最も高いものである。このプラグカラムは、1段以上の重複溶離水を含んでいる液体組成物が、約3.0MPa (4,500psi) 未満の圧力下で、厚さが1.5mmのプラグカラムを少なくとも約2.0cm×約6cmの標準流量で通過する事が可能な如き、均勻の取れた適当なマクロ相孔度と物理的強度を有している。

これらのカラムを製造する方法は、一般に、(1) ポリゲンが入って

いる脱気した重合用混合物を、筒壁を閉じた便携管の中に入れ、(2) この混合物を重合させることでマクロ相孔ボリマープラグカラムを生じさせ、そして(3) このプラグカラム（またはマクロ相孔管）を溶媒で洗浄することにより、その製造したマクロ相孔ボリマー内に存在しているポリゲンを除去することを含んでいる。

この重合混合物は、最小、少なくとも1種のモノビニルモノマー、フリーラジカルを発生する開始剤、およびポリゲンを含んでいる。この混合物はまた、1段以上のモノビニルモノマー混合およびまたは可溶ボリマー類または不溶マクロ相孔ボリマー粒子を含んでいてもよい。

適切なモノビニルモノマー類には、ジビニルベンゼン、ジビニルナフタレン、ジビニルビリジン、ジメタクリル酸アルキルジメタクリル酸ジカルボキシルカルボキシルカルボン酸、ジメタクリル酸ジカルボキシルカルボン酸、ジアクリル酸ジカルボキシルカルボン酸、ジメタクリル酸オリゴエチレングリコール酸、ジアクリル酸オリゴエチレングリコール酸、ポリカーボン酸のビニルエスチル酸、ジビニルエーテル、ベンタエリスリトールのジー、トリーやまたはテトラメタクリレートまたはクアリレート、トリメチローリルオロジのトリメタクリレートまたはアクリレート、アルキレニビスアクリルアミド類またはメタクリルアミド類、および上記適切なモノビニルモノマー類いずれかの混合物が含まれる。これらのアルキル酸は一般に約1-6個の炭素原子を含んでいる。

用いられる得るモノビニルモノマー類には、ステレン、四度換セレン等（これらの置換基はクロロメチルが含まれる）、1,18個の以下の炭素原子を有するアルキル、ヒドロキシル、ヒーピテルオキシカルボニル、ハロゲン、ニトロ、アミノ基、保護されているヒドロキシルまたはアミ

ノ基、ビニルナフタレン、アクリレート類、メタクリレート類、ビニルアセテート、二ニルビリドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマーか、またはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この重合混合物の中に約10から60体積%の量、より好適には約20から40体積%の量で存在している。

使用するポロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択される。例えば、適切な被状ポロゲン類には、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル類、アルコール類、ケトン類、ニーチル類、可溶ポリマー類の脂肪およびそれらの混合物が含まれる。このポロゲンは、一般に、この重合混合物の中に約40から90体積%の量、より好適には約60から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合せて、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらはポリマー類は、重合に先立ってその重合混合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、ブレグカラムにて浴槽を通過することによって、そのブレグカラムが生じた後のブレグカラムから溶出する。これらの可溶ポリマー類は、最終ブレグカラムの通水率を増大させるポリマー類の状態で働く。ここで用いるに適切な可溶ポリマー類は、ステレンまたは環状オレフィン、アクリレート類、メタクリレート類、ジンクジン、催化ビニルおよび脂肪ビニルの如きモノマー類の未縮合ポリマー類または共重合体が含まれる。混合中に通水率が収縮するのを低減する目的で、不溶ポリマー粒子を用いる。この重合混合物内のモノマー類の体積が低ければ低い程、重合した時の通水率が小さくなる。ここで用いるに適した不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の架橋共重合体であるマクロ孔系ポリマー粒子が含まれる。

重合を開始させる目的で、フリーラジカルを発生する通常の開始剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、0-0'-1-アミル-O-(2-エチルヘキシル)キノバオキシカボネット、ジオキシビルバオキシカバーボネットおよびベンゾイルバオキサイドの如きアボオキサイド類、並びにアビスイソブチリニトリル、2'-アゾビス(2-アミジブロブテン)ジメドロクラライドおよび2, 2'-アゾビス(イソブチルアミド)二水化合物などが含まれる。ブレグカラム内の孔分布を調節する手段として開始剤の選択が用いられることが用いられる。特に、アビスイソブチリニトリルを用いて重合を実施する時、その大きな孔は初期孔容積の5%以上であるが、それとベンゾイルバオキサイドに重複すると、その大きい孔の容積は初期孔容積の20%に低下する。この開始剤は、一般に、既モノマーの約0.2から5重量%の量でその重合混合物中に存在している。

この重合混合物をその質に入れてから、この混合物の中に存在している酸素を除去するに充分な期間、空気の如き不活性ガスをこの混合物の中にバブリングするなどの如き通気の手段で、この混合物の脱気を行う。この重合混合物を脱気して脱気を行った後、これを、適切な瓶を手で両端部を閉じた管の中に入れる。この重合混合物の全部を加えた後、重合させて單一ブレグカラムを生じさせる。別途として、この重合混合物を分割して加えてより多く、各部細孔から次の添加を行って重合を行なう。過度した浴槽で同じモノマー混合物を用いると、單一ブレグカラムが壊れる。2種以上の異なる重合混合物を過度して用いると、この方法では、2種以上の異なるブレグカラムが生じる。現在のところ好適なもののは單一ブレグカラムである。と言うのは、これは現在通常の充

填孔によりよく重合しているからである。多款ブレグカラム技術を通常の装置で適用するには困難であり、この技術は、1つの單一カラム内に異なる分離用媒体と特徴別に組み合わせることの利点を保有する新規なクロマトグラフィー様式と一緒に急速に用いられる。次に、重合を行なう装置としての管を密封する。

この混合物をその質の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90°Cの温度の通常管式で重合を実施する。この重合は、好適には窒素またはアゼチノンなどの不活性ガス室内で実施される。本分野で知られている何らかの手段を用いて熱を加けることは可能であるが、この重合混合物が入っている密封した管を、加熱した浴の中に浸漬するのが現在のところ好適である。重合中に生じる収縮はその孔構造全体に影響を与えるが、この収縮の量との関係は維持される。

重合が完了した後、この固体状のマクロ孔系ポリマーを脱水することで如何なるポロゲン浴槽も発生し、そして適切な浴槽を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄浴には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびオキソサランが含まれる。この洗浄浴は通常のに行われてもよく、例え、浴槽に続いて水で洗浄した後、再び浴槽で洗浄するか、あるいは浴槽を用いて過酸化水素することによって行われてもよい。この洗浄段階は、好適には、そのマクロ孔系ポリマーが持っている管を通してその浴槽をポンプ練度することによって実施される。

特定の場合として、特にこのカラムの次の使用にとてこのマクロ孔系ポリマーに特徴的な官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基

を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することができる。例えば、このマクロ環状ポリマーが置きさせたメタクリル酸グリシンルを含んでいる場合、このポリマーとジエチルアミンの置きアミンとを反応させるとN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパン（DEAHP）基が生じ、或は塩酸トリエチルアミンと反応させると第四級トリメチルアミノ（Q）基が生じ、また、このポリマーが有するエボキン基の加水分解を最初に生じさせた後クロロ酢酸と反応させるときカルボキシメチル（CM）基が生じ、或は置換基-1、4-ジオキサン基と反応させるときスルホン酸（SP）基が生じる。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィーで蛋白質分離に必須である。アルコート類、例えばカリウムブリオート、オクタウートおよびキサデカウートなどに反応させることにより、このマクロ環状ポリマーに疎水基を有することができる。この他の基は、疎水性蛋白質における分離基および逆相様式に必須である。また、このポリマーを、同一化合物または小さい時の化合物に特異的な親和剤（affiliants）と反応させ、これをアミニフィークロマトグラフィーで用いることができる。適切な親和剤は抗体、抗原、染料、世帯、レクチン類、蛋白質および核酸である。同様な様式で、また、他のモノマーを基とするポリマー類を複合して、全ての様式のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このグラフカラムを適切な溶媒で段階的にかはし1段階で洗浄してよい。

この洗浄方法に従事した後に別の代替方法は、その重合したグラフカラムをその管から取り出し、適切な溶媒でそれを洗浄した後、これをそのままに反応させておっている。この重合したポリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1、4-ジオキサン、トルエンまたは

ハロゲン化水素の組合物溶媒でのポリマーを洗浄してそれをの軸部を洗浄させることにより、その管の中より広い空間を占めさせるようになることができる。

この他の洗浄法は、そのマクロ環状ポリマーが入っている管は使用準備が出来ている。これは、本分野で知られている通常の技術に従い、通常クロマトグラフィーカラムとして用いられると共に、触媒、診断または吸収法の目的で用いられる。例えば、このクロマトグラフィーカラムを用いてサンプルをその成分に分離させる場合、このサンプルのための粗度として水または溶媒を使用することができる。このサンプルが入っている溶波をポンプ輸送することにより、それを、その管に人っているグラフカラムに通す。溶媒前の特徴、例えば、H、イオン強度、有機溶合性有機などを変化させることにより、分離を実現させる。この組成の勾配は、絶対、既離離または既離の性質を知らせる形であつてもよい。次に、その分離されたサンプルの後は、本分野で知られている手段を用い、染色技術を用いてそのカラムそれ自身の中、或はこのカラムからその成分が個々に溶離して来る時、このグラフカラムの下端またはこの管の外側で洗浄され得る。本発明は、うつマクロ環状ポリマーワン段階洗浄法は約1000から10000の範囲の分子量を有する材料の分離に有効性を示す。光導カラムを用いて行われる導く如何なる分離も本発明のカラムを用いて実施され得る。

以下に示す非選択性の実験例を示して本発明をここに記述するが、全ての節およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

#### 実験例1

液クロロに取り付けるに適した組合せが両端に接着で付いているステンレ

ス管型柱（内部直徑が4.6 mmであり、長さが50 mm）の1の末端を、鋼製ナットストッパーで閉じ、この管を重複バージした後、そのもう一方の端を、シリコングリム端子で閉じた。4. 8 gのメタクリル酸グリシンル、3. 2 gのジメタクリル酸エチレン、10. 8 gのシリコヘキサノール、1. 2 gのドゲカノール、および0. 08 gのアゾビシソチロトリルを混合することによって、重合して高分子物を調製した。この組合物を重量を200分離ブリッジすることによって、存在している如何なる膜も除離した。この高分子物の0. 1 mLを、その隔壁を通してその管の中に注入した後、熱電対で70 °Cにしたオイルバスの中で加熱することにより、重合を開始させた。7時間後、その管をその端から取り出し、乾燥して室温まで冷却した後、その隔壁を取り外した。この結果、このカラムは、長さが5 mmの固体状マクロ環状ポリマーのグラフカラムを含んでいた。このポリマーをメタノールで洗浄した後、この管の両端をクロマトグラフィーネットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラムに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ供給した。その圧は、0. 5 mL/分の流量の時0. 4 MPaであり、流量が1 mL/分の時0. 8 MPaであり、そして2 mL/分の時1. 6 MPaであった。次に、この流量をテトラヒドロフランに替えた際は、0. 2 mL/分の時0. 2 MPaであり、そして2 mL/分時1. 6 MPaであった。この流量に対する圧は、依然後は経験的であることがわかった。

これらの測定の後、このカラムの底を開いて、溶媒を用いてその多孔質ポリマーロッドを取り出した。

#### 実験例1-1

試合合ストック溶液を0. 15 mL用いる以外は実験例1と同様な操作を用いた。この管から取り出した後のグラフカラムの長さは9 mmであった。

このグラフカラムを50 mLの丸皿フラスコの中に入れた後、ジエチルアミンを5 mL加えた。この内容物を3時間攪拌させた。その後合せたメタクリル酸グリシンルのエボキシ基がそのアミンと反応することで、N、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロパン（DEAHP）が生じ、これらの基は、イオン交換クロマトグラフィーで蛋白質分離に適して必須である。この反応が終了した後、このロッドをメタノール、水、再びメタノールで洗浄した後、乾燥させる。このDEAHP基合量は、0. 594 ± 0. 010 mol/gであることが確認された。

この乾燥させたグラフカラムは、そのカラム管に直し、水中に2時間浸没し、その末端を歯まで閉じた後、1つの末端をHPLCクロマトグラフのポンプに連結する一方、もう1つを液体浴に連結しないままにしておいた。このような構造配置でその圧を測定した。流量が1 mL/分の時の圧は0. 5 MPaであり、3 mL/分の時のそれは1. 3 MPaであり、そして5 mL/分の時のそれは2. 2 MPaであった。UV後出浴に連結した後の圧は、0. 5 mL/分の流量の時0. 4 MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのいずれが生じなくなるまで（20分間）、0. 02 mol/Lのトリス-HCl緩衝液（pH = 7. 3）（液新液）を0. 5 mL/分の流量で用い、クロマトグラフィー条件下で洗浄した。0. 21 gのチトクロームC、リサイム、ミオグロビンおよびオガルアルブミンが入っている溶波を、ループを通して注入した後、

上記ボリマーの濃度を吸収するまでにした。このカラムを洗した上記緩衝液のポンプ輸送を20分間停止後でも、膜の糸膜は全く見られなかった。その吸収は完全的であった。次に、勾配溶出を開始した。この溶出剤を緩衝液Aから緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/Lの塩化ナトリウム）に、10分以内に直線的に変化させた。この予備試験で用いたクロマトグラフィ条件は選択性の条件から程度しが、4種の蛋白質全ての分離が観察された。これらの蛋白質の保持時間は7、4、7、7、7、9および8、1分であった。

#### 実施例11

実施例10用いたのと同じ管の中に、3mLのステレン、1、2mLのジビニルベンゼン（85%のVB）、5mLのベンジルアルコールおよび0、0.5gのベンジルオキシドから成るスティック混合物を0、3mL注入した。脱気した後、この管を閉じ、そして重量を70℃で24時間退行させた。脱脂ブランジャーを用い、長さが18mmの多孔質ボリマープラグカラムをその管から押出した後、メタノールをいくつかに分け、その中の4回洗浄した。この洗浄後でもこのプラグカラムは元の管に取り戻していた。この脱脂をテトラヒドロフランに洗えると、これはそのプラグカラムの脱脂を終了させた。約20分後、このプラグカラムの管は、その管の直径以上になった。次の脱脂洗浄でメタノールを用いて、このプラグカラムをそのカラムに戻し、そして再びメタノールをテトラヒドロフランに洗浄した。このカラム内における脂質を脱脂の変化として監視し、この管は、この家の限りの部分がまだメタノールで洗浄されている時の0、3MPaから始まって、この管のいくらか

が交換された後の10MPa以上にまで上昇した。その時点で、この装置に関する何らかの可能な損傷が生じるのを防止する目的で、この测定を終了した。

#### 実施例12

管を10分間パブリングすることによって、実施例1に記述したモノマー類の混合物を脱脂した。マクロ環孔ボリ（メタクリル酸グリシンルーコージメタクリル酸チレニ）ビードを蒸留水に浸漬した後、この水-ボリマー混合物を水流ポンプ真空下に10分間露置することによって、それらが持つ孔から空気を除去した。次に、これらのビードを連続的に空気バージで蒸留ガラスビンの中に仕込み、上記脱脂した混合化合物物の0、5mL加え、この部分をガラスで覆して置いた後、この管を密封した。その重量を70℃で6時間退行させた。この混合が終了した後、このビードの内容物は均一であるように見えた。そのメタクリル酸グリシンルが持つエボキシ基とそのガラス表面が持つシラノール基との反応が確認されることから、このビードの供給をはじまることなくこのビンからそのプロックを取り出すのは不可能であった。そのようにして、そのプロック表面からそのガラスを削離させるのは非常に大変であった。このプロックは、小さい片に割れる傾向を示さないか、彼はその元のビードとそれを連結している共重合体とのフランメントは分離する傾向を示さなかった。

#### 実施例13

ステンレス鋼製カラム（内部直径が8mmであり、長さが50mm）の1/2の末端を密封し、アルゴンでバージ洗浄した後、そのもう一方の

末端をシリコンゴム端子で閉じた。3.6mLのメタクリル酸グリシンル、2.4mLのメタクリル酸エチレン、7.2mLのジクロキサンール、1.8mLのデカノール、および0、5gのアビスイソブチロニトリルを混合することによって、混合化合物を調製した。この混合物を水流ポンプ減圧下で15分間脱脂処理した後、更に15分間空気をパブリングすることによって、溶解している気体を除去した。このカラムの管を、上記混合化合物を完全に洗浄した後、この管を密封した。この重量を70℃の水浴内で8時間退行させた。この混合が完了した後、このカラムをその管から脱脂し、そして周囲温度にまで冷却させた。長さが50mmであるそのロッドを洗浄する目的で、このカラムの両末端に在るスティッパーをクロマトグラフ用組合せに交換した後、このカラムをHPLCクロマトグラムに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ供給することによってロッドの洗浄を行うと共に、このカラムを通る流れを試験した。この管は、0、5mL/分の流量の時0、8MPaであり、1mL/分の時1、9MPaであり、2mL/分の時4MPaであり、そして5mL/分の時13MPaであった。この管は、この洗浄操作全体を繰り返して変化しなかった。このカラムを洗してポンプ供給したメタノールの全量は2000mLであった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り外した後、このカラムの入り口に1mLのエチルアルミンを注入した。このカラムの入り口と出口を、デルリン（delrin）プラグカラムで閉じた後、このカラムを、熱電対で60℃にした水浴の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた後、その末炭化のアミンをメタノールで

洗浄除去した。この洗浄過程中、このプラグカラムは脱脂し、そしてこの脱脂したボリマーが部分的にその孔を占める。これは、この洗浄過程を開始した時の管が高いことで説明される。この管は、流量が2mL/分の時3MPaであり、そして1mL/分の時1.5MPaであった。メタノールを用いて50分間洗浄した後、メタノールの1:1混合物を用いた。この管は、0、5mL/分の流量の時20MPaにまで上昇した。更に1時間後、このメタノール-水混合物を蒸留水に交換した。この管は、流量が0、5mL/分の時の0、6MPa、そして1mL/分の時の1.2、7MPaにまで低下した。最後に、このカラムを0、02モル/Lのトリス- $\text{HCl}$ 緩衝液（pH=7.0）（緩衝液A）で洗浄した。流量が0、5mL/分の時の管は5、7MPaであった。

ニトリルアルブミン（8mg/mL）、ニトリル蛋白質（1.5mg/mL）およびモデル蛋白質混合物（1.6mg/mL）が入っている溶液（2.1L）を、アルゴンを通して注入した後、緩衝液Aの流れの中で、その選択性クロロ環孔ボリープラグカラムの上に10分間脱脂させたままにした。緩衝液B（緩衝液Aの中に1モル/LのNaCl）の濃度勾配を用い、0、5mL/分の流量で上記蛋白質の洗浄を行った。図1-3に示す個々のクロマトグラムは、それらアルブミン（図1）、蛋白質（図2）およびモデル蛋白質（図3）に関するものである。2.18nmの管径でこれらの精出を行った。勾配クロマトグラフィーに通常の如く、用いた溶媒組成物の勾配から、図1-3のベースラインは平らでない。これらの図内の実線はクロマトグラムであり、そして溶媒組成の変化を示す目的で、点線を加えた。

## 実施例Ⅰ

直管が8 mmであり長さが50 mmのステンレス鋼管の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう1つの末端を液体シリコングムプラグカラムで閉じた。3 mLのステレン、2 mLのジビニルベンゼン、7.5 mLのデカノールおよび0.5 gのアブセイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。直管を1.5分間攪拌することによって、この混合物の脱気を行った。この混合物を、その隔壁を通してその鋼管中に注入した後、電熱で70 °Cにした直交浴槽内での重合を開始することにより、重合が開始させた。20時間後、この直管をその熱湯から取り出し、そして周囲温度までゆっくりと冷却した。このカラムの両端部にあたるトッパーを取り外して、単純的なクロマトグラフィカラム柱として取り換えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で1時間、そして1 mL/分の流量で30分間操作した。この2番目の洗净操作中の停止は一定して0.2 MPaであった。

このカラムの出口を封け、そして2.0 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその混合したロッドを押し出した。このロッドを直管で擦り、相称して小さい片にした後、直管ボロメトリ (perosimeter) を用いて、このボリマーの孔サイズ分布を評価した。試験を2回同じく重合した分布曲線を図4に示す。

## 実施例Ⅱ

メタノールを用いた洗净操作が完結した後、このカラムの出口端を手をUV吸光器に接触する以外は、実施例Ⅰの操作によってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル-水: 1: 1の混合物を用い、

1 mL/分の流量で2時間平衡にした。次に、この平衡を維持した後直管を2.5 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図5に示すが、ここでは、その直管に対する直管の抵抗値が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに妥当な背圧、即ち約0.4 MPa (6.0000 psig) 以下の範囲のまま、非常に高い流量でのこの連続ロッドカラムが有用であることを立証している。

テクロームC、ミオグリビンおよびヒートリバブルブレンジングで溶かした溶液をこのカラムに注入した後、匀配溶離クロマトグラフィーを開発させた。水中2.0%のアセトニトリルから水中0.0%のセキソトリルへの梯度勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終濃度に変化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で4分、1.0 mL/分で2分、1.5 mL/分で1.3分、そして2.5 mL/分で0.8分であった。このクロマトグラムを図6に示す。

## 比較実施例A

そのステンレス鋼管を軟質のボリ (テトラフルオロエチレン) 管に置き換える以外は実施例Ⅰの操作を繰り返す。そのボリマープラグカラムが備わっているその漏られる質を通常のクロマトグラフに連結した場合、4.0 MPa (6.0000 psig) のとき高い压力でも、このプラグカラムを通すトヒビドロフランの流れは本質的に全く阻害されなかつた。実施例6と同様に、この質を含め越してそのプラグカラムを取り出すことによってこのプラグカラムの孔サイズ分布を評価した時、約2.0 0.0 mm以上の孔は全く見いだされなかつた。

## 請求の範囲

1. 分散柱媒体が入っている管である高粘度液体クロマトグラフィーに適切なカラムにおいて、この装置が装置管であり、そして該分散用媒体が、該装置管内に記載されておりそしてこの装置管の断面領域全体を横切って伸びているマクロ孔孔壁ポリマーのウニバース連結プラグカラムであり、ここで、上記プラグカラムの厚さが少なくとも5 mmであり、そして上記プラグカラムは、2.000 nm未満の直管を有する小さい孔と、6.000 nm以上の直管を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このプラグカラムの全孔孔容積の少なくとも10%を占めたり、そしてここで、上記プラグカラムをボロゲン存在下の重合反応で処理することを特徴とするカラム。

2. 上記カラムがそこを通過して直管浴槽水から選択される液体を少なくとも約2.000 cm<sup>3</sup>/時直管流量および約3.0 MPa (4.50 0 psig) 未満の圧力で通過させることを特徴とする請求の範囲1のカラム。

3. 該マクロ孔孔壁ポリマープラグカラムが約30から90%の開放率を有していることを特徴とする請求の範囲1および2のカラム。

4. 該管がマクロ孔孔壁ポリマーの2倍以上の異なるプラグカラムを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-3のカラム。

5. 該マクロ孔孔壁ポリマーがボリビニルモノマーのポリマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-4のカラム。

6. 該マクロ孔孔壁ポリマーがボリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいることを特徴とする請求の範囲1-5のカラム。

7. (i) 両末端を閉じた直管全長間に、少なくとも1.0体積割のボリビニルモノマー、少なくとも4.0体積割のボロゲンおよび0.2から5.0重量%の開始剤を含んでいる脱気した混合浴槽物を加え、(ii) この混合物を該管内で重合させることによりマクロ孔孔壁ポリマープラグカラムを生じさせ、そして(iii) このボリマープラグカラムを洗浄することでのボロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、請求の範囲1-6のカラムを調製する方法。

8. 該混合浴槽物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を形成するに先立って重合を実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

9. 少なくとも2種の異なる混合浴槽物を連続的に加え、これらの混合浴槽物の各々に関して、次の混合物を形成するに先立って重合を実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

10. 該混合浴槽物を、該プラグカラムを該管の中に重合しながら実施することを特徴とする請求の範囲7の方法。

11. 痛手で先立って該管から該プラグカラムを取り出した後、直管に接することを特徴とする請求の範囲7の方法。

12. 該プラグカラムを該管に接した後、このプラグカラムを回圈させることを特徴とする請求の範囲7の方法。

13. 該混合浴槽物が更にモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲7の方法。

14. 該ボロゲンが液体または可溶ポリマー類から成る群から選択されることを特徴とする請求の範囲7および13の方法。

15. 該混合浴槽物が、重合の初期密度を低くするための不溶溶

四庫全書

リマークを含んでいることを教説とする構成の範囲での方法

16. 该ボリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立ってこの重合混合物に混和性を示さない液体に浸漬することを特徴とする請求の範囲7-15の方法。

17. 该不溶ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを該重合混合物と同じモノマーから生じさせることを特徴とする請求の範囲15の方法。

18. 請求の範囲1から6のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。

因數圖表報告

US 9209110  
SA 6601

RE: FEDERAL BUDGET/DEFICIT INFORMATION		DEFICIT FIGURE FROM THE BUDGET/DEFICIT	Information Available At
Category	Description	Value	Date
A	US-A, 2 541 001 (YAN 1980/81) see column 4; example 3	1,3	12/15/1980

Parent element and its report	Publication date	Parent/child relationship	Publication date
US-A-1-5019270	28-05-91	AU-B-1	22/03/92
		AU-B-2	20/04/92
		AU-B-3	04/05/92
		CA-B-1	20/03/92
		CA-B-2	04/04/92
		DE-B-1	24/04/92
		DE-B-2	24/04/92
		EP-B-1	24/04/92
		EP-B-2	24/04/92
		GB-B-1	24/04/92
		GB-B-2	24/04/92
GB-A-1-1880734	22-04-70	None	

For more details about this series, see *Official Journal of the Economic Group of the UN*, 1988, 10, 1-108.

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成12年3月14日(2000.3.14)

【公表番号】特表平7-501140

【公表日】平成7年2月2日(1995.2.2)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-507935

【国際特許分類第7版】

G01N 30/48

B01D 15/08

G01N 30/48

【F1】

G01N 30/48 G

B01D 15/08

G01N 30/48 M

## 5. 補正の内容

1) 特許請求の範囲を削除の如く訂正する。

2) 利用件25頁、末尾行「高く飛ばされなかった。」の後に次文を挿入する。

「本発明の実施の態様を示すと次のとおりである。

1. 分離式部品を有する管である本技術連携クロマキグラフィーに適切なカラムにおいて、上記管が吸音管であり、そして分離用課体が、被液管内に配置されておりそしてこの被液管の前面側全体を周囲で伸びているマクロ孔板ボリマーのランバース通気ボリグラムであり、ここで、上記ボリグラムの厚さは少なくとも5mmであり、そして上記ボリグラムは、200nm未満の微孔を有する小さい孔と、600nm以上の大孔を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大孔が、このボリグラムの全細孔容積の少なくてとも10%を占めており、そしてここで、上記ボリグラムをボロゲン等下の結合剤で被覆することを特徴とするカラム。

2. 上記カラムがそこを基して荷物管と水から遮断される被液を少くとも約200nm/秒の離脱速度および約3.0KHz(4.500ppm)末尾の死力で譲渡することを特徴とする上記1のカラム。

3. 前マクロ孔板ボリマーのカラムが約3.0から9.0%の割合で占有していることを特徴とする上記1および2のカラム。

4. 前後がマクロ孔板ボリマーの2種以上の中異なるボリグラムを含んでいることを特徴とする上記1-3のカラム。

5. 前マクロ孔板ボリマーがヨリニカルノマーのボリマーを含んでいることを特徴とする上記1-4のカラム。

6. 该マクロ糊乳ポリマーがボリニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいることを特徴とする上記1-5のカラム。

7. (1) 薄液相を閉じた液状全試管に、少なくとも10倍量のボリビニルモノマー、少くとも40倍量のボリケンビヨビ、2から5重量%の開始剤を含んでいる液状した液状全試管を加え、(1)この混合物を試管内で重合させることによりマクロ糊乳ポリマー-ラグカラムを生じさせ、そして(1-1)このポリマーラグカラムを洗浄することでのボロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、上記1-6のカラムを製造する方法。

8. 試験管内液を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に加えて、次の部分を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする上記7の方法。

9. 少くとも10%の異なる重合乳化剤を適量的に加え、これらの試験管内液に加えて、次の試験管を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする上記7の方法。

10. 该試験管内液を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に加えて、次の部分を添加するに先立って重合を実施することを特徴とする上記7の方法。

11. 洗浄後先立って試験管から該プラグカラムを取り出した後、管に残すことを特徴とする上記7の方法。

12. 試験管内液を試験管に残した後、このプラグカラムを洗浄することを特徴とする上記11の方法。

13. 该混合液相が更にモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする上記7の方法。

14. 该ボロゲンが液体または可溶ポリマー型からなる際から選択

されることを特徴とする上記7および13の方法。

15. 该混合液相が、試管中の液体を擴張するための不溶ポリマー粒子を含んでいることを特徴とする上記7の方法。

16. 该ポリマー粒子、該混合液相と混み合わせるに先立って、この混合液相に親和性を示さない液に説明することを特徴とする上記1-5の方法。

17. 该不溶ポリマー粒子がマクロ糊乳性を示し、そしてこれらを、該混合液相と同じモノマーから生じさせることを特徴とする上記1-5の方法。

18. 上記1から6のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。』

#### (解説)

##### 試験管の範囲

1. 分離用液体が入っている容器である直立瓶液体クロマトグラフィーに適用されるカラムにおいて、上記管が容積であり、そして試験管液体が、該試験管内に記述されておりそしてこの被試験の試験管液体を構成して伸びているマクロ糊乳ポリマーのランビース液性プラグカラムであり、ここで、上記プラグカラムの外径は少なくとも5mmであり、そして上記プラグカラムは、200ml/mLの容積を有する小さい孔と、0.01mm以上の通路を有する大きな孔の別の方を有しており、ここで、上記カラムの、このプラグカラムの全糊乳容積の少なくとも10%を占めたり。そしてここで、上記プラグカラムをボロゲン存在下の油相反応で説明することを特徴とするカラム。

2. (1) 薄液相を閉じた液状全試管に、少くとも10倍量のボリビニルモノマー、少くとも40倍量のボリケンビヨビ、2から5重量%の開始剤を含んでいる液状した液状全試管を加え、(1)この混合物を試管内で重合させることによりマクロ糊乳ポリマー-ラグカラムを生じさせ、そして(1-1)このポリマーラグカラムを洗浄することでそのボロゲンを除去する段階によって特徴づけられる。請求の範囲1に記述のカラムを製造する方法。